

ニワトリ肢芽細胞培養系を用いた前後軸形成機構の解析

著者	木村 淳
号	42
学位授与番号	1721
URL	http://hdl.handle.net/10097/38675

氏名・(本籍)	木 ^き 村 ^{むら} 淳 ^{じゅん}
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	理博第1721号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科, 専攻	東北大学大学院理学研究科(博士課程)生物学専攻
学位論文題目	ニワトリ肢芽細胞培養系を用いた前後軸形成機構の解析
論文審査委員	(主査) 教授 井出 宏之 教授 加藤 秀生 助教授 山本 博章

論文目次

序論

材料と方法

- (1) 実験動物
- (2) 肢芽細胞の培養
- (3) 培養液へのFGFの添加
- (4) totalRNAの調製
- (5) cDNAの調製
- (6) PCR
- (7) サザンハイブリダイゼーション
- (8) 遺伝子発現量の定量化と統計処理
- (9) キメラ解析
- (10) *In situ*ハイブリダイゼーション
- (11) ウイルスの調製と感染

結果

- (1) 肢芽前後軸形成に関わる遺伝子発現
- (2) 肢芽後部培養中胚葉細胞での遺伝子発現
- (3) 肢芽前部培養中胚葉細胞での遺伝子発現
- (4) 肢芽に移植された肢芽後部培養中胚葉細胞での遺伝子発現
- (5) 肢芽非AER性外胚葉細胞との共培養による肢芽後部中胚葉細胞での*Shh*の発現
- (6) *Shh*ウイルスの注入による肢芽前部中胚葉細胞の後部化の解析

論議

- (1) 後部培養中胚葉細胞の*Shh*の発現はFGF-4だけでは維持されないが、非AER性外胚葉との共培養によって維持される
- (2) 肢芽培養中胚葉において検出される*Bmp-2*の発現様式は何を意味するのか?
- (3) 後部培養細胞での*Hoxd-13*の発現はFGF-4によって維持される

- (4) FGF-4は*Shh*発現能力を維持する
- (5) *Shh*による後部化の機構
- (6) 前後軸形成におけるFGF-2、-4、-8の作用の違い
- (7) まとめ

要 約

謝 辞

参 考 文 献

図及び図の説明

論 文 内 容 要 旨

肢芽には、パターン形成に関わると考えられる2つの重要な領域が存在する。肢芽先端部の外胚葉が肥厚した外胚葉性頂堤 (AER; Apical Ectodermal Ridge) は、直下の中胚葉細胞の増殖、分化を制御して肢芽の基部先端部方向の伸長、及びパターン形成に密接に関与していると考えられる。もう1つは、肢芽中胚葉の後端部領域であり、極性化活性帯 (ZPA; Zone of Polarizing Activity) と呼ばれ、前後軸の形成に関与していると考えられている。肢芽におけるパターン形成を解析するために、実験形態学的手法、分子生物学的手法などによって、これまで様々な研究が行われてきた。その結果、Fibroblast Growth Factor (FGF) が基部先端部軸の形成に関わるAERの機能を代替しうることが明らかにされた。さらに、前後軸形成において重要な役割を果たすZPAの機能を担う遺伝子として、*Sonic hedgehog (Shh)*が単離された。*Shh*は*Bmp-2*、*HoxD*の発現を誘導して前後軸を形成していると考えられている。さらに、AERまたはFGFが*Shh*、*Bmp-2*、*Hoxd-13*の発現を維持し、背側外胚葉またはWNT-7aが*Shh*の発現を維持することが知られている。

培養中胚葉細胞において、ZPAからのシグナル分子とされる*Shh*の量的変化によって、*Bmp-2*、*Hoxd-13*の発現量がどのような変化をするのか、さらにこれらの遺伝子の発現とFGF-4との関連をRT-PCR法を用いて調べた。その結果、後部培養中胚葉細胞においてFGF-4の有無に関わらず、*Shh*の発現は急激に減少して消失すること、*Bmp-2*の発現はほぼ一定のレベルで維持されることが明らかとなった。*Hoxd-13*については、FGF-4を添加せずに培養すると、発現は緩やかに減少したが、FGF-4を添加して培養すると、発現は維持された。これらの結果から、培養細胞において、FGF-4は*Shh*の発現を維持できないこと、*Bmp-2*はFGF-4に依存しないこと、FGF-4は*Hoxd-13*の発現を維持できること、*Hoxd-13*の発現維持には恒常的な*Shh*の発現は必要ないことが示された。また、前部培養中胚葉細胞においては、*Shh*、*Hoxd-13*の発現は検出されなかったが、*Bmp-2*の発現が培養開始後3時間で検出され、FGF-4の有無に関わらず、後部中胚葉での*Bmp-2*の発現の約30~40%のレベルを維持していた。

次に、24時間培養した後部中胚葉細胞を肢芽に移植して、移植された培養細胞での遺伝子発現を調べた。FGF-4を添加せずに培養した後部細胞を移植した場合では、移植片において*Shh*の発現は検出されず、*Hoxd-13*が移植片の先端部約3分の2で発現していた。FGF-4を添加して培養した後部中胚葉細胞を移植した場合には、ホストのAER直下に分布した培養細胞で*Shh*の発現が検出され、*Hoxd-13*は移植片全体で発現していた。これらの結果から、FGF-4は、*Shh*の発現そのものを維持するのではなく、*Shh*発現能力を維持するということが示された。

*Shh*の発現は、背側外胚葉及びWNT-7aに依存していることが知られているため、中胚葉細胞と外胚葉細胞との共培養を行った。FGF-4を添加して、外胚葉と共培養した場合に*Shh*の発現が培養後48時間まで

維持されることが明らかになった。*in situ*ハイブリダイゼーションによる解析によって、外胚葉周辺の中胚葉細胞において *Shh* の発現が維持されていることが示された。

Shh による後部化の機構を解析するために、*Shh* を強制発現させた肢芽前部細胞の培養を行った。前部中胚葉細胞単独での培養では、FGF-4 を添加した場合でも、*Hoxd-13* の発現は検出できなかった。次に、外胚葉との共培養を行ったところ、FGF-4 を添加した場合に、*Hoxd-13* の発現が検出された。この結果から、SHH が *Hoxd-13* を誘導するためには非AER性外胚葉と FGF-4 が必要であることが示された。さらに、添加する FGF の種類を変えて同様な実験を行ったところ、FGF-2 を添加した場合には、*Hoxd-13* の発現は検出されたが、FGF-8 を添加した場合には、*Hoxd-13* の発現は検出されなかった。この結果は、前後軸形成に関わる遺伝子発現に対して、FGF の種類によって、作用に違いがあるということを示している。

以上の結果を元に、*Shh*, *Bmp-2*, *Hoxd-13* 間の関係、これらの遺伝子に対する FGF の作用、さらにこれらの遺伝子発現と肢芽前後軸形成過程との関係について考察した。

論文審査の結果の要旨

肢芽の前後軸は肢芽中胚葉の後端部領域、極性化活性帯（ZPA）からの情報によって決定される。ZPAの機能を担う遺伝子として、*Sonic hedgehog(Shh)*が単離された。*Shh*は*Bmp-2*, *HoxD*の発現を誘導して前後軸を形成していると考えられている。さらに、肢芽先端部外胚葉(AER)から分泌される繊維芽細胞成長因子のひとつ、FGF-4が*Shh*, *Bmp-2*, *Hoxd-13*の発現を維持すると考えられている。これらの遺伝子ネットワークは、正常肢芽あるいは遺伝子を強制発現させた肢芽での遺伝子発現の解析から明らかにされた。しかし多種の組織からなる肢芽内での解析には限界がある。そこで本研究では、培養肢芽中胚葉細胞での遺伝子発現の時間的、空間的変化を解析し、それに対するFGF-4や外胚葉組織の作用を調べることにより、遺伝子間ネットワークを詳細に検討した。

培養された後部中胚葉細胞において、FGF-4の有無に関わらず、*Shh*の発現は急激に消失したが、*Bmp-2*の発現はほぼ一定のレベルで維持された。*Hoxd-13*の発現は、FGF-4を添加せずに培養すると減少したが、FGF-4を添加して培養すると維持された。これらの結果から、培養細胞において、FGF-4は*Shh*の発現を維持できないこと、*Bmp-2*発現はFGF-4に依存しないこと、FGF-4は*Hoxd-13*の発現を維持できることが示された。しかしFGF-4を添加して24時間培養した後部中胚葉細胞を肢芽に移植すると、AER直下に分布した培養細胞で*Shh*の発現が検出された。つまりFGF-4は、*Shh*の発現そのものを維持するのではなく、*Shh*発現能力を維持するということが示された。

*Shh*の発現は、背側外胚葉に依存していることが知られているため、中胚葉細胞と外胚葉細胞との共培養を行った結果、FGF-4を添加して、外胚葉と共培養した場合に*Shh*の発現が48時間まで維持された。さらに*Shh*を強制発現させた肢芽前部細胞の培養下での後部化についても、*Hoxd-13*を誘導するためには非AER性外胚葉とFGF-4が必要であることが示された。

これらの研究は、著者が自立した研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、木村淳提出の論文は、博士（理学）の学位論文として合格と認める。